Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 740-749

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر - دی ۱۴۰۱ ص.۷۴۹-۷۴۰

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Extraction of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from common carp scales (*Cyprinus carpio*) and determination of their characteristics

Marjan Zargar[1], Bahareh Shabanpour[*2], Parastou Pourashouri[3], Ebrahim Zabihi Neyshabouri[4]

Received: 2021.12.13
Revised: 2022.02.14
Accepted: 2022.02.19
Available Online: 2022.02.19

How to cite this article:
Zargar, M., Shabanpour, B., Pourashouri, P., Zabihi Neyshabouri, E. (2022). Extraction of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from common carp scales (*Cyprinus carpio*) and determination of their characteristics. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 740-749.

Abstract

Introduction: Collagen is the most abundant and important structural protein in the connective tissue of animals, the production of which is of great importance in the fields of medicine, cosmetics and food. Due to religious restrictions as well as common diseases between livestock and humans, today collagen extraction has turned to other sources, especially aquatic sources. Therefore, the aim of this study was to extract collagen by conventional acidic and enzymatic methods from common carp scales and determine its characteristics in order to make optimal use of this waste to produce valuable products and find alternatives to collagen obtained from land animals.

Material and Method: Acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) were extracted from common carp scales (*Cyprinus carpio*) and their properties were determined. Common carp scales were prepared with the use of 0.5 M acetic acid and pepsin enzyme. Finally, the extracted collagens were lyophilized and after calculating the extraction efficiencies, their characteristics were determined by electrophoresis tests, UV spectroscopy, X-ray diffraction and isoelectric point determination.

Results and Discussion: The results showed that the extraction efficiencies of ASC and PSC were 1.9% and 2.96% (based on dry weight), respectively, which means digestion with pepsin could increase collagen efficiency up to 1.54 times. The results of SDS-PAGE analysis showed that both ASC and PSC are type I collagen and are composed of α_1, α_2 and β in the $(\alpha_1)_2\alpha_2$ chain structure; the isoelectric point of collagens was in the pH range of 5-6. The maximum absorption peak of the UV spectrum of collagen was observed at 235 nm. Although pepsin enzyme (1% dry weight of scales) increases efficiency without significant changes in collagen native structure, but its use for mass production of type I collagen in Iran is not recommended unless self-sufficiency and reduction of pepsin price achieved, while collagen extraction by acidic method is very simple and research to design a production line for this method is recommended. Common carp scales have the potential to be used as an alternative source of collagen in the food and health-pharmaceutical industries. These results can provide a solution to control the waste of the aquatic processing industry in creating environmental pollution, as well as producing a high value-added product from common carp scales.

Keywords: Scales, Common carp (*Cyprinus carpio*), Acid-soluble collagen, Pepsin-soluble collagen, Waste.

1, 2 and 3. Ph.D. Student, Professor and Associate professor, respectively, Fisheries Products Processing Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4. Associate Professor, Department of Pharmacology, Babol University of Medical Sciences, Iran.
(*Corresponding Author Email: b_shabanpour@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74164.1121

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 740-749

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۷۴۹-۷۴۰

مقاله علمی-پژوهشی

استخراج کلاژن‌های محلول در اسید و محلول در پپسین از فلس کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و تعیین ویژگی‌های آنها

مرجان زرگر[1]- بهاره شعبان‌پور*[2]- پرستو پورعاشوری[3]- ابراهیم ذبیحی نیشابوری[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

چکیده

کلاژن فراوان‌ترین و مهم‌ترین پروتئین ساختاری در بافت همبند جانوران است که تولید آن اهمیت زیادی در زمینه‌های پزشکی و دارویی، آرایشی- بهداشتی و غذایی دارد. با توجه به محدودیت‌های مذهبی و نیز بیماری‌های مشترک بین دام و انسان، امروزه استحصال کلاژن به دیگر منابع و به‌ویژه منابع آبزی معطوف شده است. بنابراین هدف این مطالعه استخراج کلاژن به دو شیوه مرسوم اسیدی و آنزیمی از فلس کپور معمولی و تعیین ویژگی‌های آن به‌منظور استفاده بهینه از این پسماند برای تولید محصولات با ارزش افزوده و یافتن جایگزینی برای کلاژن به‌دست آمده از حیوانات خشکی می‌باشد. کلاژن محلول در اسید (Acid soluble collagen) و کلاژن محلول در پپسین (Pepsin soluble collagen) از فلس کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) استخراج و خواص آنها تعیین شد. فلس‌های کپور معمولی پس از آماده‌سازی به کمک اسیداستیک ۰/۵ مولار و آنزیم پپسین تحت استخراج قرار گرفته در نهایت کلاژن استخراج شده، لیوفیلیزه شد و پس از محاسبه بازده استخراج، ویژگی‌های آن با استفاده از آزمون‌های الکتروفورز، طیف‌سنجی فرابنفش، پراش اشعه ایکس و تعیین نقطه ایزوالکتریک مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد که بازده استخراج ASC و PSC به‌ترتیب ۱/۹٪ و ۲/۹۶٪ (بر مبنای وزن خشک) بود یعنی هضم با پپسین می‌تواند تا ۱/۵۴ برابر باعث افزایش بازده کلاژن شود. نتایج آنالیز SDS-PAGE نشان داد هر دو ASC و PSC به‌عنوان کلاژن نوع I بوده و از α_1، α_2 و β در ساختار زنجیره‌ای $(\alpha_1)_2\alpha_2$ تشکیل شده‌اند؛ نقطه ایزوالکتریک کلاژن‌ها در دامنه pH ۵- ۶ قرار داشت. حداکثر پیک جذب طیف فرابنفش کلاژن‌های به‌دست آمده در ۲۳۵ نانومتر مشاهده شد. اگرچه آنزیم پپسین (۱٪ وزن خشک فلس) باعث افزایش بازده بدون تغییر معنی‌دار در ساختار کلاژن می‌شود ولی استفاده از آن برای تولید انبوه کلاژن نوع I در ایران تا رسیدن به خودکفایی و کاهش قیمت پپسین، توصیه نمی‌شود این درحالیست که استخراج کلاژن به روش اسیدی بسیار ساده بوده و تحقیق جهت طراحی خط تولید برای این روش پیشنهاد می‌شود. فلس کپور معمولی این پتانسیل را دارد که به‌عنوان منبع جایگزین کلاژن در صنایع غذایی و بهداشتی- دارویی به‌کار رود. این نتایج می‌تواند علاوه بر تولید محصول با ارزش افزوده بالا از فلس کپور معمولی، راهکاری برای کنترل ضایعات صنعت فرآوری آبزیان در ایجاد آلودگی محیط زیست ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: فلس، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، کلاژن محلول در اسید، کلاژن محلول در پپسین، ضایعات

مقدمه

در برخی از کشورهای آسیایی، آفریقایی و اروپایی، کپور ماهی‌ها، رایج‌ترین ماهیان آب شیرین هستند. فلس ماهی فرآورده جانبی در فرآوری ماهی است که مستقیماً باعث آلودگی محیط می‌شوند. این درحالیست که فلس ماهی حاوی مقدار زیادی از مواد ارزشمند از جمله حدود ۴۰ الی ۵۵ درصد مواد آلی (کلاژن، چربی، لسیتین، اسکلروپروتئین، ویتامین‌های مختلف و غیره) و حدود ۷ تا ۲۵ درصد ترکیبات معدنی (هیدروکسی آپاتیت، کلسیم فسفات و غیره) است. کلاژن فراوان‌ترین پروتئین در مهره‌داران است که حدود ۳۰٪ از کل پروتئین‌های آنها را تشکیل می‌دهد و مهم‌ترین پروتئین ساختاری در بافت همبند جانوران است که در پوست، رباط‌ها، تاندون‌ها و بسیاری از ساختارهای دیگر بدن وجود دارد (Ali et al., 2018). کلاژن، از سه زنجیره پلی‌پپتیدی مارپیچ به نام زنجیره‌های آلفا تشکیل شده است. از زمان کشف کلاژن II توسط Miller و Matukas (۱۹۶۹)، ۲۹ نوع

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، گروه عمل‌آوری فراورده‌های شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۴- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: b_shabanpour@yahoo.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74164.1121

کلاژن کشف شده است که تنوع این کلاژن‌ها به‌دلیل تفاوت در ماهیت پلی‌پپتیدهای تشکیل‌دهنده آنهاست (Richard-Blum, 2011; Li et al., 2018). فراوان‌ترین کلاژن، نوع I است که بیش از ۹۰٪ کلاژن موجود در بدن از این نوع است (Lim et al., 2019). در ماهی، کلاژن نوع I بیشتر در پوست و استخوان وجود دارد (Sliman & Sadok, 2018).

کلاژن در تشکیل بافت، اندام‌ها و فعالیت‌های گوناگون سلولی نقش مهمی دارد. از آنجایی‌که با افزایش سن، تولید کلاژن در بدن کاهش می‌یابد، از آن در رژیم غذایی و نوشیدنی‌ها و نیز به‌عنوان مکمل دارویی برای جبران این پروتئین ارزشمند استفاده می‌شود (Hashim et al., 2015). در قرن بیست و یکم، فناوری مواد غذایی برای تولید غذاهایی که می‌تواند به‌عنوان منبع تغذیه مفید باشد و همچنین خواص عملکردی خوبی که تأثیر مثبتی بر بدن انسان داشته باشد، توسعه یافته است (Said, 2020). در صنایع غذایی، از کلاژن به‌عنوان فیلم‌ها یا پوشش‌های خوراکی به صورت بسته‌بندی، غوطه‌وری عمیق، رومال کردن یا اسپری کردن بر روی مواد غذایی استفاده می‌شود. کلاژن هیدرولیز شده، یک ماده نویدبخش در صنایع غذایی به‌ویژه برای تولید نوشیدنی‌ها است. ژلاتین یکی از با ارزش‌ترین پروتئین‌ها در صنایع غذایی و زیست پزشکی است که از هیدرولیز پروتئین‌های کلاژن به‌دست می‌آید (Said, 2020). مصرف کلاژن می‌تواند موها را ضخیم کند، سبب بهبود اختلالات ناخن مانند ناخن‌های شکننده، افزایش اندازه فیبرهای کلاژن در تاندون آشیل، تحریک تراکم فیبروبلاست و تقویت تشکیل فیبرهای کلاژن در پوست و غیره شود (Chai et al., 2010). کلاژن، به‌دلیل دارا بودن خواص بسیار عالی مانند عدم ایمنی‌زایی، زیست‌سازگاری[1] و زیست تخریب‌پذیری[2]، یک ماده بیولوژیکی مهم در زمینه‌های پزشکی و دارویی است (Chen et al., 2009).

امکان اینکه کلاژن به‌عنوان ماده اصلی تشکیل‌دهنده محصولات غذایی، آرایشی بهداشتی و زیست‌دارویی باشد، به امکان تأمین مواد اولیه به‌مدت طولانی و استخراج پایدار آن بستگی دارد (Krishnan and Perumal, 2013). منابع اصلی تأمین کلاژن، دم موش، پوست گاو و پوست خوک هستند، اما عواملی مانند افزایش قیمت مواد اولیه، مسائل شرعی و بیماری‌های مشترک بین دام و انسان، در کلاژن به‌دست آمده از موجودات خشکی، توجه محققین را به استحصال کلاژن از موجودات آبزی معطوف کرده است (Nomura and Kitozome, 2002; Khong et al., 2018). در این خصوص، پسماندهای ماهی منبع مناسبی محسوب می‌شوند. میزان صید و آبزی‌پروری در سال ۱۳۹۵، ۱۰۹۳۷۱۹ تن بوده است که از این مقدار، ۴۵۹۵۲۱ تن تولید از طریق آبزی‌پروری و ۲۰۱۰۹۷ تن تولید از طریق پرورش ماهیان گرمابی بوده است (Iran Statistical Yearbook, 2016-2017). در صنعت فرآوری ماهی، بخش بزرگی از پسماندها تولید می‌شود، که به‌طور معمول ۷۰٪- ۵۰٪ از مواد اولیه را پوست، استخوان‌ها، فلس، احشاء و سر تشکیل می‌دهد. مدیریت این به اصطلاح "زباله‌ها" کاری دشوار می‌باشد، به‌طوری که گاهی مشکلات جدی برای محیط زیست به‌وجود می‌آورد. به‌طور کلی این مواد برای تولید خوراک دام یا کودهای کم‌ارزش استفاده می‌شوند. با توجه به اینکه حدود۳۰٪ یا بیشتر این پسماندها کلاژن نوع I است، اخیراً توجه بسیاری را به‌خود جلب کرده‌اند (Chai et al., 2010). کلاژن‌های استخراج شده از ماهی با مزایای بسیار، زیست‌مواد نویدبخشی در آینده این کشور هستند. تحقیقات بسیاری درباره استخراج کلاژن از ماهی وجود دارد؛ اما مطالعه استخراج کلاژن از ماهی هنوز هم به‌دلیل تفاوت در تنوع زیستی که تأثیر بسیاری بر ترکیب مولکولی و اسید آمینه کلاژن ماهی دارد، مورد توجه می‌باشد. تغییرات در خصوصیات فیزیکی پروتئین و مقدار اسیدهای آمینه در کلاژن استخراج شده از گونه‌های مختلف ماهی به‌شدت وابسته به دمای محیط پیرامون است. بنابراین، مطالعه در مورد تهیه و تعیین ویژگی‌های کلاژن ماهی برای یافتن محصولات جدید کلاژنی به‌منظور جایگزینی محصولات به‌دست آمده از کلاژن حیوانات خشکی، ضروری است (Chinh et al., 2019). بعضی روش‌ها برای استخراج کلاژن از پوست یا فلس ماهی استفاده شده است، به‌عنوان مثال، روش شیمیایی با استفاده از مواد قلیایی و اسیدی، روش بیوشیمیایی با استفاده از اسید و آنزیم یا اسید و میکروارگانیسم‌ها و استخراج با آب. با این حال، استخراج کلاژن محلول در اسید و کلاژن محلول در پپسین دو روش رایج‌تر هستند. بنابراین هدف از این مطالعه استخراج کلاژن از فلس کپور معمولی به دو روش مرسوم اسیدی و آنزیمی و تعیین خصوصیات آن بود. از آنجاکه ماهی کپور یکی از گونه‌های اصلی موجود در صنعت پرورش ماهیان آب شیرین در ایران است، فلس ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) برای مطالعه انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک، اسید استیک، کلریدسدیم و هیدروکسی متیل آمینومتان (Tris-HCl) از برند Merk (آلمان)، پپسین از برند Titrachem (چین)، سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، N,N,N,N- تترامتیل اتیلن دیآمین (TEMED)، کوماسی بلو (R-250) و نشانگرهای وزن مولکولی پروتئین (۹-۱۸۰ کیلودالتون) از برند Excel Band (تایوان) و همگی از گرید آزمایشگاهی بودند.

1 Biocompatible

2 Biodegradable

جمع‌آوری نمونه

فلس ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۱/۵– ۱ کیلوگرم در فروردین ماه سال ۱۴۰۰ به‌صورت تازه از بازار محلی ماهی‌فروشان در قائمشهر جمع‌آوری شده و در مدت ۱ ساعت به مرکز تحقیقات سلولی–مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل منتقل و تا زمان مصرف در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آماده‌سازی

در ابتدا فلس‌ها با آب شهری سرد شسته شده با قیچی به اندازه‌های ۲×۲ میلی‌متر مربع برش داده شدند. پس از ۲۴ ساعت هم زنی در سود ۰/۱ مولار با نسبت ۱:۲۰ و شستشو با آب مقطر، به‌مدت ۱ ساعت در کلریدریک اسید ۰/۶ مولار، با نسبت ۱:۱۰ تحت همزنی با همزن مغناطیسی (Lab Tech، کره) مداوم قرار گرفته و مجدداً شستشو با آب مقطر انجام گرفت (Pal et al., 2016).

استخراج کلاژن محلول در اسید

فلس‌های آماده شده، به مدت ۴۸ ساعت در اسید استیک ۰/۵ مولار با نسبت فلس به محلول ۱ به ۱۵ تحت همزنی قرار گرفتند. سپس مخلوط از صافی رد شد و فلس‌ها از محلول جدا شدند. با افزودن کلریدسدیم به محلول به‌دست آمده در حضور Tris-HCl (هیدروکسی متیل آمینومتان) ۰/۰۵ مولار برای به‌دست آوردن غلظت ۲/۵ مولار نمک‌زنی شد (با تعدیل pH تا ۷/۵)؛ سپس محلول با ۲۰۰۰۰g و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای۷ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفوژ (Sigma، آلمان) شد. ماده رسوب یافته در حداقل حجم از اسید استیک ۰/۵مولار حل شد. محلول نهایی در ۲۰ حجم از اسید استیک ۰/۱ مولار و سپس۲۰ حجم آب‌مقطر تحت دیالیز (غشای دیالیز ۱۲ کیلودالتون، سیگما، امریکا) قرار گرفت. تمام مراحل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. کلاژن استخراج شده، با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Beta2-8LD Plus، Christ، آلمان) لیوفیلیزه شد. کلاژن به‌دست آمده کلاژن محلول در اسید (ASC) بود که تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Matmaroh et al., 2011)

استخراج کلاژن محلول در پپسین

فلس‌های آماده شده، به‌مدت ۴۸ ساعت در اسید استیک ۰/۵ مولار حاوی ۱٪ پپسین (Titrachem, 9001-75-6، چین) (به نسبت وزن خشک فلس) با نسبت فلس به محلول ۱ به ۱۵ تحت همزنی قرار گرفتند. سپس مخلوط از صافی رد شد و فلس‌ها از محلول جدا شدند. با افزودن کلریدسدیم به محلول به‌دست آمده در حضور Tris-HCl(هیدروکسی متیل آمینومتان) ۰/۰۵ مولار (pH ۷/۵) برای به‌دست آوردن غلظت ۲/۵ مولار نمک‌زنی شد؛ سپس محلول با ۲۰۰۰۰g و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای۷ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Sigma، آلمان) شد. ماده رسوب‌یافته در حداقل حجم از اسید استیک ۰/۵مولار حل شد. محلول نهایی در ۲۰ حجم از اسید استیک ۰/۱ مولار و سپس۲۰ حجم آب‌مقطر تحت دیالیز (غشای دیالیز ۱۲ کیلودالتون، سیگما، امریکا) قرار گرفت. تمام مراحل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. کلاژن استخراج شده، با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Beta2-8LD Plus، Christ، آلمان) لیوفیلیزه شد. کلاژن به‌دست آمده با کمک آنزیم پپسین کلاژن محلول پپسین (PSC) نامیده شده تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Matmaroh et al., 2011)

محاسبه بازده کلاژن خالص

بازده کلاژن به صورت درصد و بر مبنای وزن خشک، با رابطه ذیل محاسبه شد (Khong et al., 2018).

(۱) ۱۰۰ ×(وزن خشک فلس مورد استفاده/ وزن خشک کلاژن لیوفیلیزه)= درصد بازده (بر پایه وزن خشک)

الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)[1]

الگوهای پروتئینی نمونه‌های کلاژن، با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید سدیم سولفات دودسیل طبق روش Laemmli (۱۹۷۰) تعیین شدند. نمونه‌ها روی ژل‌های پلی‌آکریل آمید متشکل از یک ژل جداکننده ۷/۵٪ و ژل ردیف کننده ۴٪ بارگذاری شدند و با استفاده از یک دستگاه الکتروفورز (مینی پروتئین II، Biorad، انگلستان) در جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر تحت الکتروفورز قرار گرفتند. نشانگر پروتئینی (۹– ۱۸۰ کیلودالتون، Excel Band، تایوان) برای تخمین وزن مولکولی پروتئین‌ها استفاده شد (Laemmli et al., 1970).

تعیین نقطه ایزوالکتریک[2]

نمونه‌های کلاژن در اسید استیک ۰/۵ مولارحل شدند تا غلظت نهایی ۰/۰۵ به‌دست آید. پتانسیل (ζ) Zeta محلول کلاژن با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Malvern، سری زتاسایزر، انگلستان) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. pH محلول‌های کلاژن در دامنه ۳– ۸ تنظیم شد.

1 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDSPAGE)

2 The isoelectric point (IEP)

پتانسیل زتا (ζ) در هر درجه افزایش pH مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Khong et al., 2018).

طیف‌سنجی فرابنفش

این آزمایش با استفاده از اسپکتروفتومتر (Jenway، انگلستان) در گستره ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر انجام شد. نمونه‌ها با انحلال کلاژن در محلول اسید استیک ۰/۵ مولار با نسبت نمونه به محلول ۱ به ۱۰۰۰ (وزنی/ حجمی) آماده‌سازی شدند (Li et al., 2018).

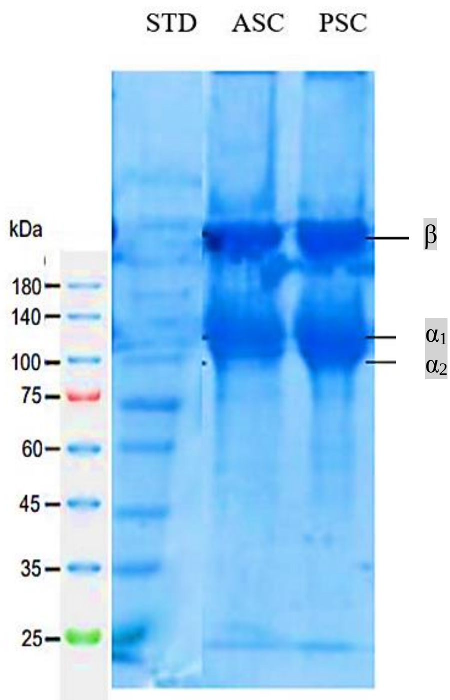
پراش پرتو ایکس

الگوهای پراش اشعه ایکس (XRD) کلاژن لیوفیلیزه، توسط یک دیفراکتومتر اشعه ایکس (Jenway، انگلستان) با استفاده از تابش -Cu Ka در ۳۵ کیلوولت و ۲۰ میلی‌آمپر با طول موج $\lambda = 1.5406$ Å به‌دست آمدند. اسکن در دامنه $2\theta = 5° - 30°$ با گام ۰/۰۲ درجه‌ای و سرعت اسکن ۲ درجه در دقیقه انجام شد (Alves et al., 2017).

نتایج و بحث

بازده

پیوند (-C= N-) بین مولکول‌های کلاژن را می‌توان در شرایط اسیدی از بین برد، به این ترتیب ساختار محکم کلاژن سست‌تر شده و استخراج کلاژن تسهیل می‌شود. با این حال، غلظت زیاد اسید ممکن است منجربه تخریب کلاژن شده و ساختار طبیعی آن را از بین ببرد. بنابراین، در این کار غلظت کمتری از اسید استیک (۰/۵ مولار) استفاده شد (Wu et al., 2019).



شکل ۱- الگوی الکتروفورز ژل پلی آکریل‌آمید دودسیل سولفات برای نمونه‌های کلاژن فلس کپور معمولی.STD : نشانگر مولکولی پروتئین، ASC: کلاژن محلول در اسید، PSC: کلاژن محلول در پپسین

Fig. 1. Polyacrylamide dodecyl sulfate gel electrophoresis pattern for common carp scale collagen samples. STD: protein molecular marker, ASC: acid-soluble collagen, PSC: pepsin-soluble collagen

بازده کلاژن‌های ASC و PSC استخراج شده از فلس کپور معمولی به‌ترتیب ۱/۹۱٪ و ۲/۹۶٪ (براساس وزن خشک) بود. نتیجه نشان داد استفاده از ۱٪ پپسین برای استخراج بازده کلاژن را ۱/۵۴ برابر افزایش داد. بازده استخراج برای کلاژن‌های ASC و PSC در فلس بزماهی طلایی خال‌دار به‌ترتیب ۰/۴۶ و ۱/۲۰٪ (Matmaroh et al., 2011) و در فلس کپورنقره‌ای ۰/۸۶٪ و ۲/۳۲٪ (Zhang et al., 2010) گزارش شد. ساختار کلاژن به‌دلیل یکسری پیوندهای متقابل کووالانسی بین مولکولی، بسیار پایدار است و به‌طور کلی در آب، اسید یا قلیای رقیق، محلول نمکی خنثی و حلال‌های آلی معمول، نامحلول است. با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که توالی تکراری اسید آمینه Gly-X-Y تشکیل شده در پایانه -C و پایانه -N زنجیره پپتیدی وجود ندارد که نشان‌دهنده یک منطقه غیرمارپیچی است

(Shamansky et al., 1989). پپسین قادر است در چنین منطقه غیرمارپیچی عمل کرده و پیوندهای کووالانسی و غیرکووالانسی که ساختار کلاژن را تثبیت می‌کنند را از بین ببرد و از این‌رو انحلال کلاژن را بهبود ببخشد؛ بنابراین پپسین می‌تواند برای استخراج کلاژن از فلس استفاده شود (Hong et al., 2018). تفاوت کارآیی پپسین در استخراج کلاژن بستگی به گونه ماهی، ترکیب و پیکربندی کلاژن، مقدار پپسین مورد استفاده و غیره دارد (Matmaroh et al., 2011).

الگوی پروتئینی SDS-PAGE

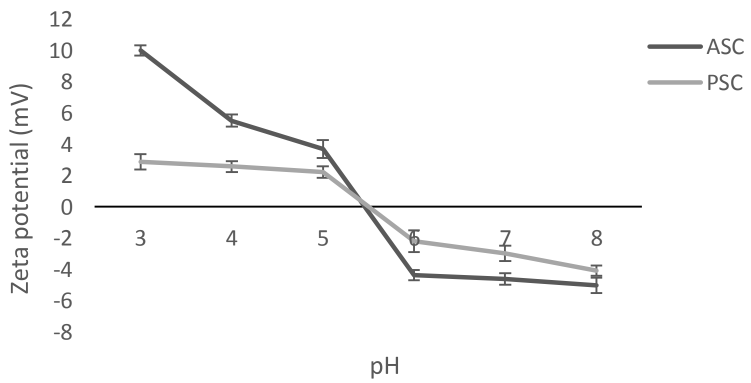
الگوی پروتئینی نمونه‌های کلاژن محلول در اسید (ASC) و کلاژن محلول در آنزیم پپسین (PSC) استخراج شده از فلس کپور معمولی با استفاده از آزمون SDS-PAGE تعیین شد که در شکل ۱ آمده است. با توجه به الگوهای پروتئینی، کلاژن های به‌دست آمده از فلس کپور معمولی از زنجیره های α (α_1 و α_2) و β تشکیل شده‌اند که ازنظر وزن مولکولی با کلاژن فلس بزماهی طلایی خال‌دار (Matmaroh et al., 2011) و کلاژن فلس کپور ماهی چینی (Panda et al., 2014) که به‌عنوان کلاژن نوعI با دو زنجیره α ($(\alpha_1)_2\alpha_2$) دسته‌بندی شدند، مشابهت داشت.

با توجه به پهنای باند، نسبت زنجیره های α_1 به α_2 به‌صورت ۱:۲ (دو زنجیره α_1 و یک زنجیره α_2) بود از این رو آنها به‌عنوان کلاژن نوع I طبقه‌بندی شدند که مهمترین کلاژن در پوست، فلس و استخوان ماهی است (Chinh et al., 2019; Matmaroh et al., 2011). کلاژن استخراج شده به روش اسیدی از فلس گونه‌های مختلف مانند ساردین، سیم دریایی سرخ، باس دریایی ژاپنی (Nagai et al., 2004)، روهو و کاتلا (Pati and Dhara, 2010) نیز به‌عنوان کلاژن نوع I بودند. تفاوت وزن مولکولی زنجیره‌های آلفا در کلاژن ممکن است به دلیل منابع مختلف فلس ماهی باشد (Panda et al., 2014). در مقایسه با ASC، وزن مولکولی زنجیره‌های α_1 و α_2 در PSC اندکی کمتر بود اما شدت زنجیره‌های α بیشتر بود. پپسین توانست تا حدی منطقه تلوپپتیدی را شکافته، منجربه کوتاه شدن طول زنجیره و کاهش وزن مولکولی آن شود (Ali et al., 2018). لازم به ذکر است که در الگوی پروتئینی، ممکن است که زنجیره α_3 وجود داشته باشد اما به دلیل اینکه این زنجیره دارای وزن مولکولی برابر با زنجیره α_1 است، بنابراین نمی‌توان آن‌را تشخیص داد. علاوه‌براین، زنجیره β نیز در کلاژن‌های استخراج شده وجود داشت که دارای وزن مولکولی بالاتر از زنجیره‌های α و پیوندهای عرضی زیاد می‌باشند نشان می‌دهد که کلاژن‌های استخراج‌شده از اتصالات متقابل مولکولی بالایی برخوردار هستند (Ali et al., 2018; Matmaroh et al., 2011).

نقطه ایزوالکتریک

مقدار pHای که درآن بارهای مثبت و منفی روی یک مولکول پروتئین در یک سیستم آبی برابر هستند یا درآن بار خالص پروتئین صفر است، نقطه ایزوالکتریک (pI) نامیده می‌شود (Barzideh et al., 2013).

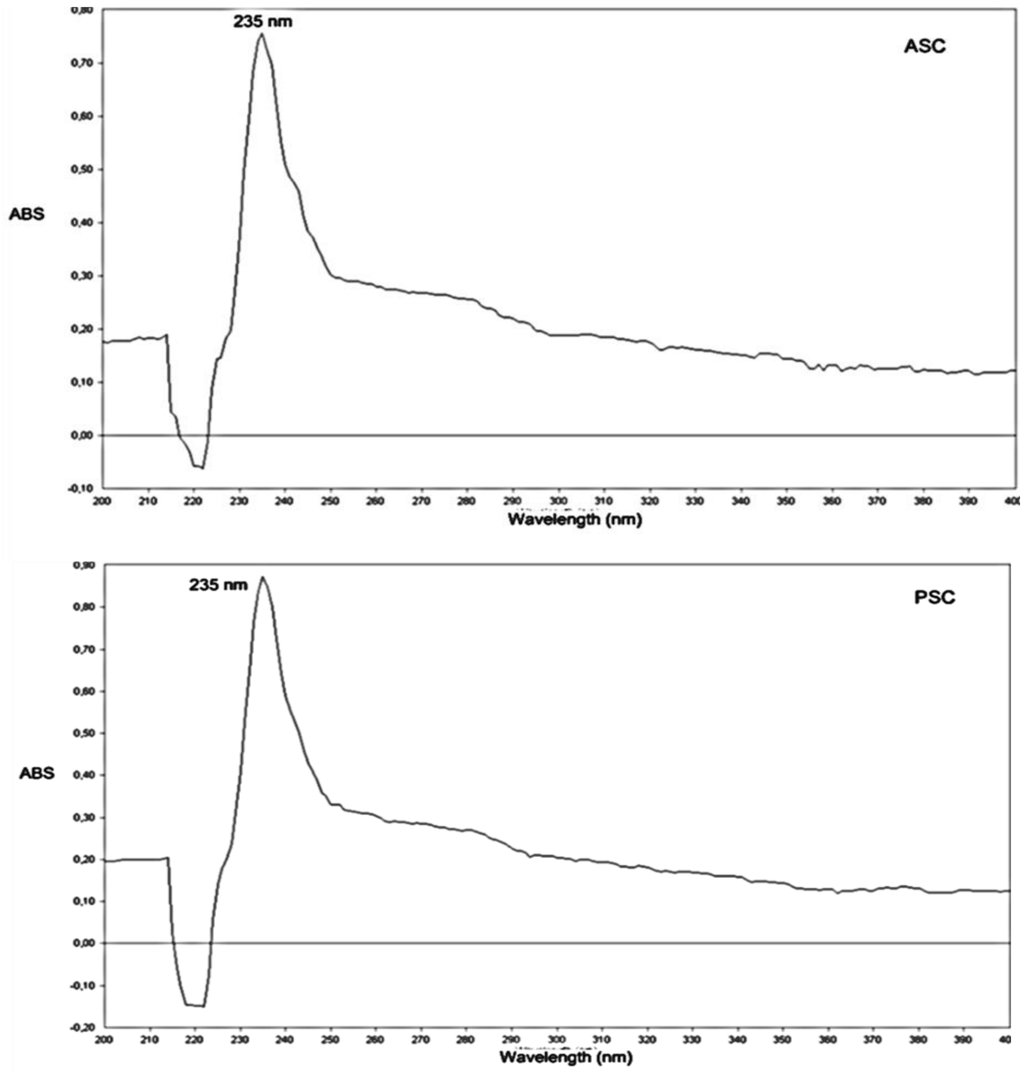
بار سطحی کلاژن‌های ASC و PSC در pHهای مختلف با استفاده از تحلیل‌گر پتانسیل زتا اندازه‌گیری شد. هر دو کلاژن در pH اسیدی (۳ تا ۵/۵) دارای بار خالص مثبت بودند. با افزایش مقادیر pH، بار کلاژن کاهش یافته و نقطه ایزوالکتریک (pI) هر دو کلاژن، در محدوده pH معادل ۶- ۵ برآورد شد که منطقه اسیدی می‌باشد. علت این امر را می‌توان به محتوای بالای گروه کربوکسیل اسیدهای آمینه اسیدی مانند گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید نسبت داد. نقطه ایزوالکتریک PSC اندکی بالاتر از ASC بود.



شکل ۲- پتانسیل زتا در نمونه‌های کلاژن محلول در اسید (ASC) و کلاژن محلول در پپسین (PSC) فلس کپور معمولی

Fig. 2. Zeta potential in acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) samples of common carp scales

این امر به احتمال زیاد به‌دلیل حذف برخی از اسیدهای آمینه در منطقه غیرمارپیچی کلاژن در PSC است (Ali et al., 2018; Barzideh et al., 2013). پپسین ممکن است ناحیه تلوپپتیدی را شکافته و منجربه تفاوت در ترکیب اسید آمینه در زنجیره‌های α شود (Benjakul et al., 2010). نقطه ایزوالکتریک کلاژن برای عروس دریایی در pH معادل ۶/۶۴ (Barzideh et al., 2013)، برای کلاژن ASC و PSC از کپور طلایی در pH معادل ۶/۱۱ و ۶/۲۱ (Ali et al., 2018) برای کلاژن ASC و PSC فلس بزماهی طلایی خالدار در pHهای معادل ۴/۹۶ و ۵/۳۹ بود (Matmaroh et al., 2011). تفاوت در نقاط ایزوالکتریک کلاژن‌های به‌دست آمده از منابع متفاوت را می‌توان به ترکیب متفاوت اسیدهای آمینه نسبت داد. در pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک، کلاژن‌ها بار منفی را نشان می‌دهند. هرچه pH قلیایی‌تر، مقادیر بالاتری از بار منفی به‌دست آمد (Ali et al., 2018).



شکل ۳- طیف فرابنش نمونه‌های کلاژن فلس کپور معمولی (ASC: کلاژن محلول در اسید ، PSC: کلاژن محلول در پپسین)

Fig. 3. Ultraviolet spectrum of common carp scale collagen samples (ASC: acid-soluble collagen, PSC: pepsin-soluble collagen)

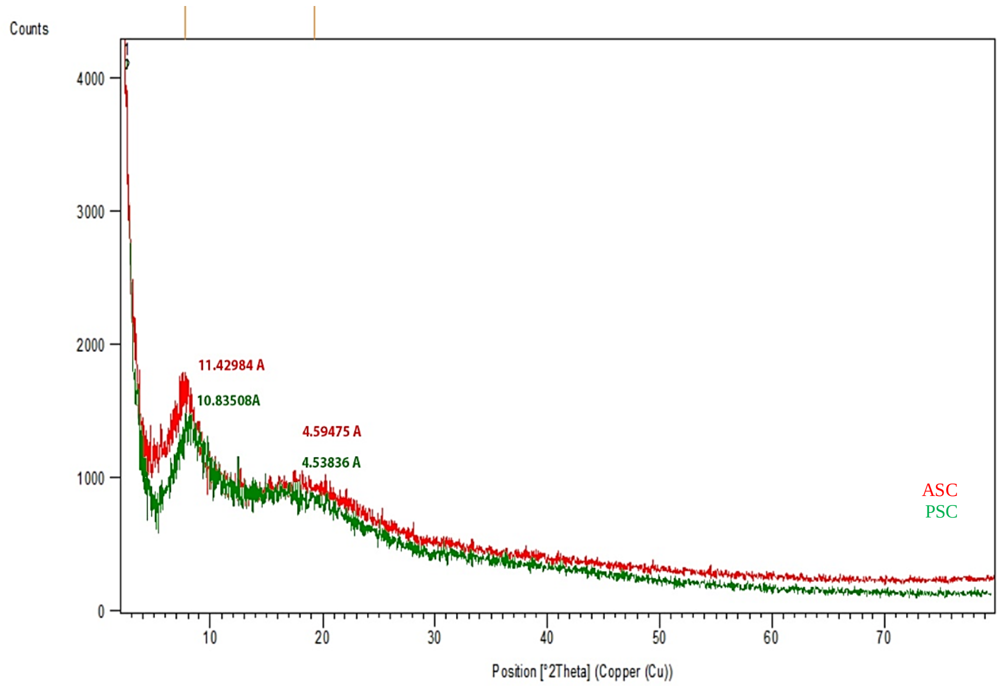
طیف‌سنجی فرابنفش

پروتئین‌ها زیست مولکول‌های درشتی هستند که از یک یا چند اسیدآمینه تشکیل شده‌اند. حداکثر طول موج جذب اسیدهای آمینه معطر فنیل‌آلانین، تیروزین و تریپتوفان به‌ترتیب در دامنه ۲۵۰ الی ۲۷۰، ۲۷۰ الی ۲۹۰ و ۲۸۰ الی ۳۰۰ نانومتر است. تحقیقات نشان داده است مولکول پروتئین در صورتی که حداکثر جذب را در دامنه ۲۱۰- ۲۴۰ نانومتر نشان دهد، کلاژن می‌باشد (Wu et al., 2015; Yu et al., 2014). در طیف‌سنجی فرابنفش نمونه‌های کلاژن ASC و PSC

به‌دست آمده ازفلس کپور معمولی، حداکثر پیک جذب در ۲۳۵ نانومتر بود (شکل ۳) که احتمالاً به‌دلیل باندهای پپتیدی گروه‌های C=O، COOH و $CONH_2$ در زنجیره‌های پلی‌پپتیدی کلاژن بود (Yu et al., 2014). در ۲۸۰ نانومتر جذب بسیار ضعیف برای کلاژن‌ها مشاهده شد که به‌دلیل جذب اسیدآمینه‌های آروماتیک بود. این نتایج در راستای یافته‌های Li و همکاران (۲۰۱۴) در کلاژن‌های فلس میویی کروکر (۲۲۰ نانومتر) و Chinh و همکاران (۲۰۱۹) در فلس کپور آب‌های شیرین گرمسیری (۱۹۲ نانومتر) بود (Chinh et al., 2019, Li et al., 2018).

طیف‌سنجی پرتو ایکس

پراش اشعه ایکس اغلب برای ارزیابی ساختار کریستالی کلاژن، توزیع فیبریل و جهت‌گیری کلاژن در بافت‌های معدنی ماهی استفاده می‌شود (Zhang et al, 2011). شکل۴ طیف اشعه ایکس کلاژن استخراج شده محلول در اسید (الف) و نیز کلاژن استخراج شده با استفاده از آنزیم پپسین (ب) از فلس کپور معمولی را نشان می‌دهد. بین ساختارهای این دو کلاژن تفاوت خاصی قابل مشاهده نبود بدین معنی که آنزیم پپسین، علیرغم افزایش بازده استخراج، تاثیری برساختار مولکول کلاژن نداشته است. الگوی پراش پرتو ایکس در هر دو کلاژن مشابه و دارای دو پیک مشخص بود. این دو پیک مشخصه مولکول کلاژن است و می‌تواند به‌عنوان یک ویژگی خاص دیده شود. نتایج به‌دست‌آمده از طیف اشعه ایکس کلاژن‌های لیوفیلیزه فلس ماهی کپور معمولی مطابق با نتایج کریستال‌های کلاژن لیوفیلیزه به‌دست آمده از فلس ماهی کپور (Zhang et al, 2011) و ماهی تیلاپیا نیل (El-Rashidy et al., 2015) بود. اولین و تیزترین پیک مربوط به ترکیب مارپیچ سه گانه و فاصله بین زنجیره های مولکولی است. قله دوم مربوط به فاصله بین اسکلت‌ها است. زوایای پراش (2θ) کلاژن محلول در اسید ۷/۷ و ۱۹ درجه و کلاژن محلول در پپسین ۸/۲ و ۲۰ بود. حداقل مقادیر (d) فواصل مکرر، با استفاده از معادله براگ $d(Å)= \lambda/2\sin\theta$ (λ= 1.54 Å) محاسبه شد (Zhang et al, 2011). در کلاژن محلول در اسید، d مربوط به قله تیز ۱۱/۴۲ Å و برای قله پهن ۴/۵۹ Å و در کلاژن محلول در پپسین ۱۰/۸۳ Å برای قله تیز و ۴/۵۳ Å برای قله پهن بود. این مقادیر با مقادیر گزارش شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۱) و نیز مقادیر گزارش شده توسط Alves و همکاران (۲۰۱۷) برای کلاژن نوع ۱ پوست قزل آلای رنگین کمان و Elrashidy و همکاران (۲۰۱۵) برای کلاژن فلس تیلاپیای نیل مطابقت داشت و تأییدکننده این مطلب بود که کلاژن به‌دست آمده از فلس کپور معمولی ساختار مارپیچ سه گانه‌ای دارد (Zhang et al, 2011; El-Rashidy et al., 2015; Alves et al., 2017).



شکل ٤- پراش اشعه ایکس نمونه‌های کلاژن فلس کپور معمولی (ASC: کلاژن محلول در اسید، PSC: کلاژن محلول در پپسین)

Fig 4- X-ray diffraction of common carp scale collagen samples (ASC: acid-soluble collagen, PSC: pepsin-soluble collagen)

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، ASC و PSC از فلس‌های کپور معمولی به دو روش اسیدی و آنزیمی استخراج شدند. بازده ASC و PSC به‌ترتیب ۱/۹۱٪ و ۲/۹۶٪ بود. هضم با پپسین باعث افزایش تولید کلاژن تا ۱/۵۴ برابر شد. طیف فرابنفش نشان داد که پروتئین استخراج شده در هر دو روش، کلاژن است. پروفایل SDS-PAGE هر دو کلاژن، مشابه و تشکیل شده از α_1، α_2 و β بود که نشان داد که ASC و PSC به‌دست آمده از فلس کپور معمولی، کلاژن نوع I هستند. نقطه ایزوالکتریک کلاژن‌ها در دامنه pH ۵ الی۶ به‌دست آمد. نتایج پراش اشعه ایکس نیز نشان‌دهنده حفظ ساختار مارپیچ سه‌گانه در کلاژن‌های استخراج شده با استفاده از اسید و نیز آنزیم پپسین بود. اگرچه آنزیم پپسین (۱٪ وزن خشک فلس) باعث افزایش بازده بدون تغییر معنی‌دار در ساختار کلاژن می‌شود ولی با توجه به قیمت بالای آن از یکسو و فراوانی فلس و دیگر ضایعات آبزیان به‌عنوان منبع اولیه تآمین کلاژن نوعI، استفاده از پپسین جهت تولید انبوه کلاژن نوع I در ایران تا رسیدن به خودکفایی و کاهش قیمت پپسین، توصیه نمی‌شود این درحالیست که استخراج کلاژن به روش اسیدی بسیار ساده بوده و تحقیق جهت طراحی خط تولید برای این روش توصیه می‌گردد. بنابراین فلس کپور معمولی این پتانسیل را دارد که یک منبع جایگزین برای تولید کلاژن نوع I جهت کاربرد در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی باشد. علاوه بر این، اطلاعات کلاژن فلس کپور معمولی به‌دست آمده در این مطالعه ممکن است یک پایه تئوری برای توسعه فرآوری ضایعات شیلاتی مربوط به فناوری بازیافت با هدف کاهش آلودگی محیط زیست و افزایش ارزش افزوده باشد.

منابع

1. Ali AMM, Benjakul S, Prodpran T and Kishimura H, (2018). Extraction and characterisation of collagen from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*), a processing by-product. Waste Biomass Valori 9: 783-791. https://doi.org/10.1007/s12649-017-9841-0
2. Ali AMM, Hideki K and Soottawat B, (2018). Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry*, 66: 237-244. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.003
3. Alves AL, Marques ALP, Martins E, Silva TH and Reis RL, (2017). Cosmetic potential of marine fish skin collagen. Cosmetics 4: 39. https://doi.org/10.3390/cosmetics4040039
4. Barzideh, Z, Latiff AA, Gan CY, Benjakul S and Karim AA, (2013). Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (*Chrysaora sp.*). *International Journal of Food Science and Technology*. 49(6), 1490-1499. https://doi.org/10.1111/ijfs.12464
5. Benjakul S, Thiansilakul Y, Visessanguan W, Roytrakul S, Kishimura H and Prodpran T, (2010). Extraction and characterisation of pepsin solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science Food and Agriculture* 90(1): 132-138. https://doi.org/10.1002/jsfa.3795
6. Chai HJ, Li JH, Huang HN, Li TL, Chan YL, Shiau CY and Wu CJ, (2010). Effects of sizes and conformations of fish-scale collagen peptides on facial skin qualities and transdermal penetration efficiency. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. https://doi.org/10.1155/2010/757301
7. Chattopadhyay S and Raines RT, (2014). Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing. *Biopolymers* 101(8): 821-833. https://doi.org/10.1002/bip.22486
8. Chen Z, Wei B, Mo X, Lim CT, Ramakrishna S and Cui F, (2009). Mechanical properties of electro spun collagen–chitosan complex single fibers and membrane. *Materials Science and Engineering* C 29 (8): 2428-2435. https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.07.006
9. Chinh NT, Manh VQ, Trung VQ, Trang TDM, Hoang T, (2019). Characterization of collagen derived from tropical freshwater carp fish scale wastes and its amino acid sequence. *Natural Product Communications* 14(7).
10. Dermal Fillers, (2013). The Ageing Skin. Pharmaxchange. info. Retrieved on 2013-04-21.
11. El-Rashidy AA, Gad A, Abu-Hussein AE, Habib S, Badr NA and Hashem AA, (2015). Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticas*) fish scale collagen. *International Journal of Biological Macromolecules* 79: 618-626. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.019
12. Hashim P, Mohd Ridzwan MS, Bakar J and Hashim DM, (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal* 22 (1): 1-8.
13. Hong H, Roy BC, Chalamaiah M, Bruce HL and Wu JP, (2018). Pretreatment with formic acid enhances the production of small peptides from highly cross-linked collagen of spent hens. *Food Chemistry* 258: 174. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.036
14. Khong NMH, Yusoff FMd, Jamilah B, Basria M, Maznaha I, Chana KW, Armaniaa N and Nishikawad J, (2018). Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*)

with increased physical-induced solubilization processes. *Food Chemistry* 251: 41-50. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.083

15. Krishnan S and Perumal P, (2013). Preparation and biomedical characterization of jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha*) collagen from southest coast of India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5 (3).
16. Laemmli UK, (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685. https://doi.org/10.1038/227680a0
17. Li LY, Zhao YQ, He Y, Chi CF and Wang B, (2018). Physicochemical and antioxidant properties of acidand pepsin-soluble collagens from the scales of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Marine Drugs* 16: 394. https://doi.org/10.3390/md16100394
18. Lim YS, Ok YJ, Hwang SY, Kwak JY and Yoon S, (2019). Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. *Marine Drugs* 17: 467. https://doi.org/10.3390/md17080467
19. Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, Encarnacion AB and Kishimura H, (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry* 129(3): 1179-1186. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099
20. Miller EJ and Matukas VJ, (1969). Chick cartilage collagen: A new type of a1 chain not present in bone or skin of the species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 64: 1264-1268. https://doi.org/10.1073/pnas.64.4.1264
21. Nagai T, Izumi M and Ishii M, (2004). Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. *International Journal of Food Science and Technology* 39(3): 239-244. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00777.xNomura y and Kitozome N, (2002). Use of shark collagen for cell culture and *zymography*. *Bioscience Biotechnology, Biochemistry* 66 (12): 2673-2676. https://doi.org/10.1271/bbb.66.2673
22. Pal P, Srivas PK, DadhichP, Das B, Maity PP, Moulik D and Dhara S, (2016). Accelerating full thickness wound healing using collagen sponge of mrigal fish (*Cirrhinus cirrhosus*) scale origin. *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 1507-1518. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.032
23. Panda NN, Pramanik K and Sukla LB, (2014). Extraction and characterization of biocompatible hydroxyapatite from fresh water fish scales for tissue engineering scaffold. *Bioprocess Biosystem* 37: 433. https://doi.org/10.1007/s00449-013-1009-0
24. Pati F, Adhikari B and Dhara S, (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology* 101(10): 3737-3742. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.133
25. Ramshaw JA, Peng Y, Glattauer V and Werkmeister JA, (2009). Collagens as biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (1): S3-S8. https://doi.org/10.1007/s10856-008-3415-4
26. Richard-Blum S, (2011). Collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3: a004978. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978
27. Slimane EB and Sadok S, (2018). Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. *Marine Drugs* 16: 211. https://doi.org/10.3390/md16060211
28. Said MI, (2020). IOP Conference Series: Earth and Environronmental Science. 492, 012086. DOI:10.1088/1755-1315/492/1/012086
29. Wu J, Kong L, Zhang J and Chen W, (2019). Extraction and properties of acid-soluble collagen and pepsin-soluble collagen from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Scales: Prerequisite information for fishery processing waste reuse. *Polish Journal of Environmental* Studies 28(4): 2923-2930. https://doi.org/10.1007/s10068-015-0264-z
30. Wu QQ, Li T, Wang B, Ding GF, (2015). Preparation and characterization of acid and pepsin-soluble collagens from scales of croceine and redlip croakers. *Food Science Biotechnology* 24: 2003-2010. https://doi.org/10.1007/s10068-015-0264-z
31. Shamansky LM, Pratt D, Boisvenue RJ and Cox GN, (1989). Cuticle collagen genes of *haemonchus-contortus* and caenorhabditis-elegans are highly conserved. *Molecular and Biochemical Parasitology* 37 (1): 73. https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90104-7
32. Yu D, Chi CF, Wang B, Ding GF and Li Z, 2014. Characterization of acid and pepsin soluble collagens from spine and skull of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines* 12: 712-720.
33. Zhang J, Duan R, Ye C and Konno K, 2010. Isolation and characterization of collagens from scale of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Food Biochemistry* 34(6): 1343-1354. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00439.x
34. Zhang F, Wang A, Li Z, He S and Shao L, (2011). Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales. *Food Nutrient Science* 2: 818-823. DOI:10.4236/fns.2011.28112